

VU Research Portal

Development of peptide-based antimicrobial strategies against biological warfare agents

Sijbrandij, T.

2020

document version

Publisher's PDF, also known as Version of record

[Link to publication in VU Research Portal](#)

citation for published version (APA)

Sijbrandij, T. (2020). *Development of peptide-based antimicrobial strategies against biological warfare agents*. [PhD-Thesis - Research and graduation internal, Vrije Universiteit Amsterdam].

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

E-mail address:

vuresearchportal.ub@vu.nl

SAMENVATTENDE DISCUSSIE

In dit proefschrift werden verschillende experimentele benaderingen gebruikt om peptiden en peptideconjugaten te ontwikkelen als tegenmaatregelen tegen biologische oorlogsmiddelen (BWA). De benaderingen werden gekozen op verschillende niveaus van actie: bacteriële adhesie aan oppervlakken, bacteriële groei, bacteriële overleving en bacteriële pathogenese:

- A. In **hoofdstuk 2** werden peptideconjugaten gegenereerd voor anti-adhesieve coatings
- B. In **hoofdstuk 3** werd de interferentie op bacteriële groei en ontwikkeling door korte peptiden afgeleid van *Escherichia coli* geanalyseerd
- C. In hoofdstuk 4 werd de antimicrobiële activiteit van van lactoferrine afgeleide peptiden geanalyseerd
- D. In **chapter 5**, In hoofdstuk 5 werden de effecten van lactoferrine afgeleide peptiden op bacteriële adhesie en invasie van eukaryote cellen onderzocht

A. Interferentie met bacteriële hechting

Het onderzoek in hoofdstuk 2 was gericht op de ontwikkeling van een biomateriaal dat micro-organismen afstoot, waardoor hechting aan oppervlakken wordt voorkomen. Over het algemeen worden dergelijke biomaterialen gekenmerkt door de aanwezigheid van groeiwerende coatings, die niet-bindende of afstotende eigenschappen vertonen ten opzichte van micro-organismen [1-4].

Het model-oppervlak in deze in vitro studie was polystyreen, dat intrinsiek affiniteit toont voor bacteriën door hydrofobe interacties. In eerste instantie was dit oppervlak voorgecoat met peptide P3, het oppervlaktebindende domein van speekselagglutinine [5]. Om het voorgecoate oppervlak met bacteriewerende eigenschappen te functionaliseren, werd vervolgens een hydrofiel polyethyleen (PEG) deel covalent geconjugéerd aan P3 met behulp van het enzym sortase A (SrtA) [6]. SrtA behoort tot de sortase-familie van transpeptidase-enzymen en katalyseert de sequentiespecifieke ligatie van eiwitten in Gram-positieve bacteriën. In vivo conjugéert SrtA eiwitten aan de bacteriële celwand door een geconserveerd LPXTG-motief te herkennen en vervolgens de peptidebinding tussen threonine (T) en glycine (G) te splitsen. Dit wordt dan gevolgd door de vorming van een covalente binding tussen het carboxy-uiteinde van het gesplitste eiwit en het aminogroepuiteinde van penta-glycine-kruisbruggen in het peptidoglycaan. [7-10]. De aanwezigheid van dit P3-PEG-conjugaat resulteerde in een significante afname van de hechting van *Y. pseudotuberculosis* van ongeveer 45%, wat wijst op een succesvolle conjugatie van P3 met PEG door SrtA.

In algemene termen hangt de hechting van PEG aan een oppervlak af van de chemische eigenschappen van het oppervlak of vereist chemische modificatie van het oppervlak, wat kan resulteren in veranderingen van de fysische eigenschappen van het oppervlak. Fysieke adsorptie,

chemische adsorptie, directe covalente hechting en blok- of entcopolymerisatie zijn enkele van de andere technieken die zijn gebruikt om PEG covalent aan oppervlakken te hechten [4, 11, 12]. Koppeling van PEG aan sterk hechtende peptiden in oplossing kan het risico van aggregatie van deze peptiden genereren, wat een effectieve coating belemmert [13]. De methode beschreven in **hoofdstuk 2**, waarbij het verankerende peptide wordt voorgecoat voorafgaand aan conjugatie, kan een manier zijn om dit probleem op te lossen.

Als proof of concept biedt deze methode mogelijkheden voor de ontwikkeling van coatings die bacteriële adhesie en daaropvolgende biofilmvorming remmen en voorkomen, in het bijzonder van biomedische materialen die niet vatbaar zijn voor directe covalente binding. Deze methode kan ook voor andere doeleinden worden gebruikt, zoals het bouwen van een kunstmatig vlies op het tandoppervlak ter bescherming tegen tandslijtage en plaquevorming.

B. Interferentie met bacteriegroei en ontwikkeling

Eenmaal gehecht aan een oppervlak kunnen bacteriën zich ontwikkelen tot biofilms; gemeenschappen van micro-organismen die groeien in een zelf geproduceerde extracellulaire matrix [14]. Binnenin deze biofilm groeien bacteriën beschermd tegen omgevingsstress zoals uitdroging, antimicrobiële middelen en aanvallen door het immuunsysteem van de gastheer. Bacteriën binnen een biofilm coördineren de ontwikkeling die leidt tot verdere rijping van de biofilm [14]. Coördinatie van deze activiteiten vindt plaats via een mechanisme van cel-tot-celcommunicatie: quorumsensing (QS) [15, 16]. Over het algemeen hebben de boodschappermoleculen, quorumsensing signaalmoleculen, een laag molecuulgewicht en behoren ze tot een breed scala aan chemische klassen, waaronder acylhomoserinelactonen, furanosylboraatdiesters, onverzadigde vetzuren en peptiden. [14].

QS geeft bacteriën het vermogen om de populatiedichtheid en de beschikbaarheid van voedingsstoffen te herkennen door de accumulatie van een QS-molecuul in de biofilm te meten. Boven een bepaalde drempel wordt een reactie geactiveerd, wat leidt tot aanpassing en een specifiek fenotype. Als de voedingswaarde bijvoorbeeld laag wordt, kunnen sommige Gram-positieve bacteriën, zoals *Bacillus* spp, sporenvorming vertonen.

Onderzoek impliceert dat QS-pentapeptiden van *Escherichia coli*, bekend als extracellulaire doodsfactoren (EDF's), een toxine-antitoxinesysteem activeren in *E. coli*, dat onder specifieke omstandigheden leidt tot geprogrammeerde celdood. De effecten van deze peptiden samen met antibiotica zoals rifampicine zijn goed gedocumenteerd [17, 18], toch is er weinig kennis over de effecten van de peptiden zelf.

In **hoofdstuk 3** werden verschillende EDF's en EDF-varianten geanalyseerd op hun effecten op de groei en ontwikkeling van bacteriën. Sommige EDF's hadden een zichtbaar effect op *Bacillus globigii* door de bacteriële celgrootte te verkleinen. Vervolgens werd een structuur-functieanalyse uitgevoerd

met EDF-varianten. Eerst werden de EDF-stereo-isomeren (EDF's samengesteld uit D-aminozuren) geanalyseerd. Dit resulteerde in een verlies aan activiteit, wat suggereert dat het EDF-doelwit een stereospecifieke receptor kan zijn. Ten tweede werd het sterk geconserveerde tryptofaanresidu vervangen door alanine. Tryptofaan heeft een hydrofobe groep, die vaak verband houdt met membraaninteractie of passage. In lijn ging de EDF-activiteit verloren, wat de noodzaak van membraaninteracties voor activiteit suggereert [19].

C and D. Antimicrobiële activiteit en ondersteuning van het immuunsysteem

Antimicrobiële peptiden (AMP's) (ook bekend als Host Defense Peptides, HDP's) omvatten een familie van natuurlijk voorkomende antimicrobiële stoffen en worden beschouwd als veelbelovende aanknopingspunten voor de ontwikkeling van nieuwe antibiotische verbindingen. AMP's worden overal in de levende natuur aangetroffen in planten en dieren en vormen de hoeksteen van een evolutionair oud verdedigingssysteem dat mogelijk miljarden jaren oud is [20, 21]. De meeste AMP's zijn eenvoudige, korte peptiden met een breed spectrum aan activiteit tegen gramnegatieve en grampositieve bacteriën, schimmels, virussen en parasieten.

Veel AMP's zijn inherent gestructureerd om zich te richten op en interactie te hebben met de lipidedubbellaag van het bacteriële membraan: AMP's zijn kationisch en blijken interactie te hebben met anionische fosfolipiden. Omdat bacteriële membranen anionische moleculen bevatten die naar de buitenkant van de cel zijn gericht, zullen de kationische AMP's bij voorkeur binden aan de blootgestelde negatieve ladingen van bacteriële membranen, maar minder aan de zwitterionische zoogdiermembranen. [22]. Deze specificiteit voor anionische membraancomponenten wordt ook nagebootst in model liposoomstudies. Vanwege dit algemene werkingsmechanisme van binding aan en verstoring van membranen, vertonen AMP's zeer weinig neiging om resistentie op te wekken [21, 23]. Het is aangetoond dat AMP's effectief zijn tegen multiresistente stammen die van nature kunnen voorkomen of die zo ontwikkeld zijn [24-26]. Naast hun membraaneffecten vertonen AMP's andere nuttige eigenschappen voor de behandeling van infecties: bijvoorbeeld endotoxinebinding (bijv. LPS van gramnegatieve bacteriën) waardoor overdreven immuunresponsen, zoals septische shock, worden voorkomen [27-30].

Ondanks vele aantrekkelijke eigenschappen blijven de uitdagingen om een succesvol AMP op de markt te brengen aanzienlijk. **Tabel 1** geeft een overzicht van de (theoretische) voor- en nadelen van antimicrobiële peptiden als afzonderlijke therapeutische antimicrobiële middelen [31-34]. Van de potentiële pool van duizenden natuurlijke peptiden en miljoenen synthetische peptidemogelijkheden, zijn er relatief weinig daadwerkelijk overgegaan tot klinische proeven op basis van veelbelovende gegevens uit in-vitro- en dierstudies [35-39].

Een interessante observatie is dat sommige AMP's zijn afgeleid van grotere eiwitten door proteolytische afbraak. Een bekend voorbeeld is het ijzerbindende eiwit lactoferrine. Dit multifunctionele 80 kDa glycoproteïne wordt uitgescheiden als een aangeboren immunitetsfactor in secretoire vloeistoffen zoals tranen, speeksel en melk en wordt ook aangetroffen in de korrels van de neutrofielen [40]. Van lactoferrine is bekend dat het een bacteriedodende, fungicide en antivirale werking heeft, evenals antitumorale, ontstekingsremmende en immuunregulerende eigenschappen [41]. Lactoferricine (LFcin) wordt gewonnen door splitsing van lactoferrine door pepsine. Het bestaat uit een positief geladen en lusvormig peptide dat residuen 17-41 bevat en heeft een krachtigere bacteriedodende en fungicide werking dan het oorspronkelijke eiwit [42, 43].

TABEL 1: VOOR- EN NADELEN VAN PEPTIDEN VOOR ANTIMICROBIËLE OF THERAPEUTISCHE DOELEINDEN

Voordelen	
-	Breed werkingsspectrum (ontstekingsremmend, antibacterieel, antiviraal en schimmelwerend)
-	Snel begin van het doden met mogelijk lage geïnduceerde resistentie
-	Selectiviteit voor bacteriële membranen
-	Toegankelijk via standaard organische synthese, structurele optimalisatie mogelijk
-	Koppeling aan functionele groepen
Nadelen	
-	Systemische en lokale toxiciteit en immunogene effecten
-	Gevoeligheid voor proteolyse
-	Neiging tot aggregatie
-	Snelle verwijdering uit de bloedsomloop door de lever en de nieren
-	Verminderde activiteit op basis van zout-, serum- en pH-gevoeligheid
-	Overgevoeligheid en allergie na herhaaldelijk aanbrengen
-	Verstorende biologische functies (bijv. Angiogenese)
-	Hoge fabricagekosten

Verschillende onderzoeken naar LFcin en verwante synthetische peptiden hebben een breedspectrumactiviteit tegen Gram-positieve en Gram-negatieve bacteriën aangetoond. Bovendien is aangetoond dat LFcin antischimmel-, antivirale en antitumoractiviteit bezit, een regulerende rol speelt bij de adaptieve immuunrespons en ontstekingsremmende eigenschappen heeft. [44]. Naast LFcin bevat lactoferrine een tweede stuk, lactoferrampin (LFampin) genaamd, met kenmerken die kenmerkend zijn voor antimicrobiële peptiden, namelijk de aanwezigheid van positief geladen residuen en een hydrofoob domein dat tryptofaan bevat, een residu dat vaak betrokken is bij membraan kruising [45, 46].

De wederzijdse oriëntatie van de twee antimicrobiële domeinen gelokaliseerd aan de rand van het N1-domein heeft ons ertoe aangezet om een chimeer peptide te genereren dat bestaat uit LFcín- en LFampin-strekkingen. Deze LFchimera vertoonde een sterkere breedspectrum bacteriedodende activiteit dan zijn samenstellende peptiden, hetzij afzonderlijk, hetzij als een mengsel. LFchimera bleek ook minder gevoelig voor isotone zoutomstandigheden [47-51].

In **hoofdstuk 4** vergeleken we de antibacteriële activiteit van runderlactoferrine, LFcín17-30, LFampin265-284, een combinatie van LFcín17-30 en LFampin265-284 en LFchimera tegen *Yersinia pseudotuberculosis*, *Yersinia enterocolitica*, *Bacillus globigii*, *Bacillus cereus* en *Salmonella typhimurium* drie methoden. Celdood werd gemeten door kolonietelling en membraanpermeabiliteit werd beoordeeld met een propidiumjodide-assay en een DiSC3 (5) -assay. Over het algemeen zouden de bacteriedodende activiteiten van de peptiden verband kunnen houden met hun membraanverstorende effecten. Die effecten waren het meest prominent voor de LFchimera. Arginineresiduen bleken cruciaal te zijn voor antimicrobiële activiteit, aangezien lysine naar argininesubstituties resulteerden in een verhoogde antimicrobiële activiteit, die voornamelijk LFampin beïnvloedde 265-284, terwijl arginine naar lysinesubstituties resulteerden in een verminderde bacteriedodende activiteit, voornamelijk in het geval van LFcín17-30 [52].

Zoals *Yersinia* spp. hechten aan gastheercellen en deze binnendringen na infectie hebben we de effecten van LFchimera op deze processen verder onderzocht in **hoofdstuk 5**. Subletale concentraties van LFchimera hadden geen effect op de adhesie van *Yersinia* spp. naar HeLa-epitheelcellen, maar remde de invasie in de cellen. Er werd vastgesteld dat dit effect van LFchimera wordt gemedieerd door de HeLa-cellen en niet door de bacteriën. Interessant is dat, in overeenstemming met de huidige studie, LFchimera de invasie van *E. coli* in Hep-2 (van HeLa afgeleide) cellen remde [53]. Invasie door *Yersinia* spp. hangt af van de expressie van invasin op het bacteriële celoppervlak. Dit eiwit bindt zich met hoge affiniteit aan β 1-integrines op het celoppervlak en roept vervolgens clustering van β 1-integrines op [54]. Het mechanisme van invasie door *Yersinia* spp. kan verband houden met het effect van invasin op β 1-integrinen, maar moet nog worden onderzocht [55]. Remming van de invasie door LFchimera kan zelfs uitgroeien tot een therapie tegen infecties door invasieve pathogenen. Om een voorbeeld te geven: toediening van LFchimera verlaagde het sterftecijfer van 90% naar 50% van BALB / c-muizen die intragastrisch waren geïnoculeerd met *E. coli* O157: H7 [49].

Toekomstige experimenten zouden het effect van LFchimera op BWA-infecties kunnen onderzoeken. In deze context moet de rol van pro-inflammatoire cytokines worden overwogen. Zowel LFchimera als de *Yersinia* spp. veroorzaakten een pro-inflammatoire cytokine-afgifte uit de cellen. Virulente stammen van *Y. enterocolitica* genereren een lagere IL-8-respons door HeLa-cellen dan niet-virulente stammen, wat het vermogen van de ziekteverwekker om de respons van het aangeboren

immuunsysteem te verlagen kan verklaren [56, 57]. We laten zien dat in de aanwezigheid van LFchimera de invasie van de *Yersinia* spp leidt tot een verhoogde IL-8-secretie, wat impliceert dat de beschermende rol van LFchimera zoals hierboven beschreven mogelijk verband houdt met een meer succesvolle vroege immuunrespons op invasieve pathogenen.

Alles bij elkaar genomen laten deze bevindingen zien dat van lactoferrine afgeleide peptiden, in het bijzonder de LFchimera, uitstekende aanknopingspunten kunnen zijn voor de ontwikkeling van (ondersteunende) therapieën tegen bacteriën, waaronder die welke mogelijk als BWA worden gebruikt.

Referenties

1. Riga EK, Vohringer M, Widyaya VT, Lienkamp K: **Polymer-Based Surfaces Designed to Reduce Biofilm Formation: From Antimicrobial Polymers to Strategies for Long-Term Applications.** *Macromolecular rapid communications* 2017, **38**(20).
2. Francolini I, Vuotto C, Piozzi A, Donelli G: **Antifouling and antimicrobial biomaterials: an overview.** *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica* 2017, **125**(4):392-417.
3. Moran G, Ramos-Chagas G, Hugelier S, Xie X, Boudjemaa R, Ruckebusch C, Sliwa M, Darmanin T, Gaucher A, Prim D *et al*: **Superhydrophobic polypyrene films to prevent Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa biofilm adhesion on surfaces: high efficiency deciphered by fluorescence microscopy.** *Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology* 2018, **17**(8):1023-1035.
4. Gabriel M, Nazmi K, Veerman EC, Nieuw Amerongen AV, Zentner A: **Preparation of LL-37-grafted titanium surfaces with bactericidal activity.** *Bioconjug Chem* 2006, **17**(2):548-550.
5. Bikker FJ, Cukkemane N, Nazmi K, Veerman EC: **Identification of the hydroxyapatite-binding domain of salivary agglutinin.** *European journal of oral sciences* 2013, **121**(1):7-12.
6. Sijbrandij T, Cukkemane N, Nazmi K, Veerman EC, Bikker FJ: **Sortase A as a tool to functionalize surfaces.** *Bioconjugate chemistry* 2013, **24**(5):828-831.
7. Navarre WW, Schneewind O: **Surface proteins of gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope.** *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* 1999, **63**(1):174-229.
8. Schneewind O, Model P, Fischetti VA: **Sorting of protein A to the staphylococcal cell wall.** *Cell* 1992, **70**(2):267-281.
9. Mazmanian SK, Liu G, Ton-That H, Schneewind O: **Staphylococcus aureus sortase, an enzyme that anchors surface proteins to the cell wall.** *Science* 1999, **285**(5428):760-763.
10. Ton-That H, Liu G, Mazmanian SK, Faull KF, Schneewind O: **Purification and characterization of sortase, the transpeptidase that cleaves surface proteins of Staphylococcus aureus at the LPXTG motif.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1999, **96**(22):12424-12429.
11. Llanos GR, Sefton MV: **Immobilization of poly(ethylene glycol) onto a poly(vinyl alcohol) hydrogel: 2. Evaluation of thrombogenicity.** *J Biomed Mater Res* 1993, **27**(11):1383-1391.

12. Banerjee I, Pangule RC, Kane RS: **Antifouling coatings: recent developments in the design of surfaces that prevent fouling by proteins, bacteria, and marine organisms.** *Adv Mater* 2011, **23**(6):690-718.
13. Dalsin JL, Hu BH, Lee BP, Messersmith PB: **Mussel adhesive protein mimetic polymers for the preparation of nonfouling surfaces.** *J Am Chem Soc* 2003, **125**(14):4253-4258.
14. Solano C, Echeverez M, Lasa I: **Biofilm dispersion and quorum sensing.** *Current opinion in microbiology* 2014, **18**:96-104.
15. Ng WL, Bassler BL: **Bacterial quorum-sensing network architectures.** *Annual review of genetics* 2009, **43**:197-222.
16. Rutherford ST, Bassler BL: **Bacterial quorum sensing: its role in virulence and possibilities for its control.** *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 2012, **2**(11).
17. Kolodkin-Gal I, Hazan R, Gaathon A, Carmeli S, Engelberg-Kulka H: **A linear pentapeptide is a quorum-sensing factor required for mazEF-mediated cell death in *Escherichia coli*.** *Science* 2007, **318**(5850):652-655.
18. Kolodkin-Gal I, Engelberg-Kulka H: **The extracellular death factor: physiological and genetic factors influencing its production and response in *Escherichia coli*.** *Journal of bacteriology* 2008, **190**(9):3169-3175.
19. Sijbrandij T, Kaman WE, Ligtenberg AJ, Nazmi K, Veerman EC, Bikker FJ: ***Bacillus globigii* cell size is influenced by variants of the quorum sensing peptide extracellular death factor.** *Antonie van Leeuwenhoek* 2014, **105**(1):221-228.
20. Zasloff M: **Antimicrobial peptides of multicellular organisms.** *Nature* 2002, **415**(6870):389-395.
21. Zasloff M: **Innate immunity, antimicrobial peptides, and protection of the oral cavity.** *Lancet* 2002, **360**(9340):1116-1117.
22. Epand RM, Vogel HJ: **Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action.** *Biochimica et biophysica acta* 1999, **1462**(1-2):11-28.
23. Ghosh C, Sarkar P, Issa R, Haldar J: **Alternatives to Conventional Antibiotics in the Era of Antimicrobial Resistance.** *Trends in microbiology* 2019, **27**(4):323-338.
24. Brook I, Elliott TB, Pryor HI, 2nd, Sautter TE, Gnade BT, Thakar JH, Knudson GB: **In vitro resistance of *Bacillus anthracis* Sterne to doxycycline, macrolides and quinolones.** *International journal of antimicrobial agents* 2001, **18**(6):559-562.
25. Dawson RM, Liu CQ: **Properties and applications of antimicrobial peptides in biodefense against biological warfare threat agents.** *Critical reviews in microbiology* 2008, **34**(2):89-107.
26. Stepanov AV, Marinin LI, Pomerantsev AP, Staritsin NA: **Development of novel vaccines against anthrax in man.** *Journal of biotechnology* 1996, **44**(1-3):155-160.

27. Nagaoka I, Hirota S, Niyonsaba F, Hirata M, Adachi Y, Tamura H, Tanaka S, Heumann D: **Augmentation of the lipopolysaccharide-neutralizing activities of human cathelicidin CAP18/LL-37-derived antimicrobial peptides by replacement with hydrophobic and cationic amino acid residues.** *Clinical and diagnostic laboratory immunology* 2002, **9**(5):972-982.
28. End C, Bikker F, Renner M, Bergmann G, Lyer S, Blaich S, Hudler M, Helmke B, Gassler N, Autschbach F *et al*: **DMBT1 functions as pattern-recognition molecule for poly-sulfated and poly-phosphorylated ligands.** *European journal of immunology* 2009, **39**(3):833-842.
29. Nell MJ, Tjabringa GS, Wafelman AR, Verrijck R, Hiemstra PS, Drijfhout JW, Grote JJ: **Development of novel LL-37 derived antimicrobial peptides with LPS and LTA neutralizing and antimicrobial activities for therapeutic application.** *Peptides* 2006, **27**(4):649-660.
30. Scott MG, Vreugdenhil AC, Buurman WA, Hancock RE, Gold MR: **Cutting edge: cationic antimicrobial peptides block the binding of lipopolysaccharide (LPS) to LPS binding protein.** *Journal of immunology* 2000, **164**(2):549-553.
31. Fosgerau K, Hoffmann T: **Peptide therapeutics: current status and future directions.** *Drug discovery today* 2015, **20**(1):122-128.
32. Koczulla AR, Bals R: **Antimicrobial peptides: current status and therapeutic potential.** *Drugs* 2003, **63**(4):389-406.
33. Yeaman MR, Yount NY: **Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance.** *Pharmacological reviews* 2003, **55**(1):27-55.
34. Gordon YJ, Romanowski EG, McDermott AM: **A review of antimicrobial peptides and their therapeutic potential as anti-infective drugs.** *Current eye research* 2005, **30**(7):505-515.
35. Andres E, Dimarcq JL: **[Cationic anti-microbial peptides: from innate immunity study to drug development].** *La Revue de medecine interne* 2004, **25**(9):629-635.
36. Andres E, Dimarcq JL: **Clinical development of antimicrobial peptides.** *International journal of antimicrobial agents* 2005, **25**(5):448-449.
37. Hancock RE, Sahl HG: **Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies.** *Nature biotechnology* 2006, **24**(12):1551-1557.
38. Negahdaripour M, Owji H, Eslami M, Zamani M, Vakili B, Sabetian S, Nezafat N, Ghasemi Y: **Selected application of peptide molecules as pharmaceutical agents and in cosmeceuticals.** *Expert opinion on biological therapy* 2019:1-13.
39. Tan Y, Liu W, Zhang Q, Cao S, Zhao H, Wang T, Qi Z, Han Y, Song Y, Wang X *et al*: **Yersinia pestis YopK Inhibits Bacterial Adhesion to Host Cells by Binding to the Extracellular Matrix Adaptor Protein Matrilin-2.** *Infection and immunity* 2017, **85**(8).
40. Farnaud S, Evans RW: **Lactoferrin--a multifunctional protein with antimicrobial properties.** *Molecular immunology* 2003, **40**(7):395-405.

41. Brock J: **Lactoferrin: a multifunctional immunoregulatory protein?** *Immunology today* 1995, **16**(9):417-419.
42. Bellamy W, Takase M, Wakabayashi H, Kawase K, Tomita M: **Antibacterial spectrum of lactoferricin B, a potent bactericidal peptide derived from the N-terminal region of bovine lactoferrin.** *The Journal of applied bacteriology* 1992, **73**(6):472-479.
43. Tomita M, Bellamy W, Takase M, Yamauchi K, Wakabayashi H, Kawase K: **Potent antibacterial peptides generated by pepsin digestion of bovine lactoferrin.** *Journal of dairy science* 1991, **74**(12):4137-4142.
44. Brock JH: **Lactoferrin--50 years on.** *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire* 2012, **90**(3):245-251.
45. van der Kraan MI, Groenink J, Nazmi K, Veerman EC, Bolscher JG, Nieuw Amerongen AV: **Lactoferrampin: a novel antimicrobial peptide in the N1-domain of bovine lactoferrin.** *Peptides* 2004, **25**(2):177-183.
46. Bolscher JG, van der Kraan MI, Nazmi K, Kalay H, Grun CH, Van't Hof W, Veerman EC, Nieuw Amerongen AV: **A one-enzyme strategy to release an antimicrobial peptide from the LFampin-domain of bovine lactoferrin.** *Peptides* 2006, **27**(1):1-9.
47. Silva T, Abengozar MA, Fernandez-Reyes M, Andreu D, Nazmi K, Bolscher JG, Bastos M, Rivas L: **Enhanced leishmanicidal activity of cryptopeptide chimeras from the active N1 domain of bovine lactoferrin.** *Amino acids* 2012, **43**(6):2265-2277.
48. Leon-Sicaire N, Canizalez-Roman A, de la Garza M, Reyes-Lopez M, Zazueta-Beltran J, Nazmi K, Gomez-Gil B, Bolscher JG: **Bactericidal effect of lactoferrin and lactoferrin chimera against halophilic *Vibrio parahaemolyticus*.** *Biochimie* 2009, **91**(1):133-140.
49. Flores-Villasenor H, Canizalez-Roman A, Velazquez-Roman J, Nazmi K, Bolscher JG, Leon-Sicaire N: **Protective effects of lactoferrin chimera and bovine lactoferrin in a mouse model of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 infection.** *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire* 2012, **90**(3):405-411.
50. Flores-Villasenor H, Canizalez-Roman A, Reyes-Lopez M, Nazmi K, de la Garza M, Zazueta-Beltran J, Leon-Sicaire N, Bolscher JG: **Bactericidal effect of bovine lactoferrin, LFcin, LFampin and LFchimera on antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*.** *Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine* 2010, **23**(3):569-578.
51. Bolscher JG, Adao R, Nazmi K, van den Keybus PA, van 't Hof W, Nieuw Amerongen AV, Bastos M, Veerman EC: **Bactericidal activity of LFchimera is stronger and less sensitive to ionic strength than its constituent lactoferricin and lactoferrampin peptides.** *Biochimie* 2009, **91**(1):123-132.

52. Sijbrandij T, Ligtenberg AJ, Nazmi K, Veerman EC, Bolscher JG, Bikker FJ: **Effects of lactoferrin derived peptides on simulants of biological warfare agents.** *World journal of microbiology & biotechnology* 2017, **33**(1):3.
53. Flores-Villasenor H, Canizalez-Roman A, de la Garza M, Nazmi K, Bolscher JG, Leon-Sicaire N: **Lactoferrin and lactoferrin chimera inhibit damage caused by enteropathogenic *Escherichia coli* in HEp-2 cells.** *Biochimie* 2012, **94**(9):1935-1942.
54. Dersch P, Isberg RR: **A region of the *Yersinia pseudotuberculosis* invasin protein enhances integrin-mediated uptake into mammalian cells and promotes self-association.** *The EMBO journal* 1999, **18**(5):1199-1213.
55. Sijbrandij T, Ligtenberg AJ, Nazmi K, van den Keijbus PAM, Veerman ECI, Bolscher JGM, Bikker FJ: **LFchimera protects HeLa cells from invasion by *Yersinia* spp. in vitro.** *Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine* 2018, **31**(6):941-950.
56. Schulte R, Wattiau P, Hartland EL, Robins-Browne RM, Cornelis GR: **Differential secretion of interleukin-8 by human epithelial cell lines upon entry of virulent or nonvirulent *Yersinia enterocolitica*.** *Infection and immunity* 1996, **64**(6):2106-2113.
57. Schulte R, Grassl GA, Preger S, Fessele S, Jacobi CA, Schaller M, Nelson PJ, Autenrieth IB: ***Yersinia enterocolitica* invasin protein triggers IL-8 production in epithelial cells via activation of Rel p65-p65 homodimers.** *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2000, **14**(11):1471-1484.